ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASEN - INHIBITOREN AUS SAMENBLASEN VON MEERSCHWEINCHEN

Friedrich Hammer

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0084

Aus dem Institut
für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. W e r l e

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASEN - INHIBITOREN AUS SAMENBLASEN VON MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich Hammer

aus

Amberg/Opf.

München 1972

DISSERTATIONSDRUCK -SCHÖN- München 23, Belgradstr. 11

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle
Priv.-Doz. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 2. 1972

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Einleitung und Thema		7
Theoretischer Teil		8
I.	Wirkungsweise der Proteinaseninhibitoren	8
	1. Spezifität	8
	2. Reaktives Zentrum	9
	3. Reaktionsmechanismus	9
	4. Temporäre Hemmung	9
II.	Isolierungsverfahren für Inhibitoren	10
	1. Klassische Methoden	10
	2. Isolierung mit Trypsinharz	10
III.	Physiologische Bedeutung und kurze Übersicht über die wichtigsten Proteinaseninhibitoren	11
	1. Bedeutung	11
	2. Übersicht	11
	a) Pflanzliche Inhibitoren	12
	b) Tierische Inhibitoren	12
IV.	Proteinaseninhibitoren in der Therapie	15
	1. Inhibitoren beim Schockgeschehen	15
	2. Inhibitoren und Pankreatitis	16
	3. Inhibitoren und Blutgerinnung	17

C. Eigene Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion 18

I. Reindarstellung der Inhibitoren aus Samenblasen von Meerschweinchen 18

1. Extraktgewinnung 18

2. Enteiweißung der Extrakte 20

a) mit Perchlorsäure 20

b) durch Gelfiltration 21

3. Filtration an Sephadex G-25 21

4. Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex C-25 22

5. Spezifische Aktivität 29

II. Charakterisierung der Inhibitoren 30

1. Hemmverhalten 30

a) Hemmspektrum 30

b) Hemmkurven 30

c) Temporäre Hemmung 32

2. Bestimmung der Endgruppen 33

3. Aminosäurezusammensetzung 33

III. Untersuchungen am reaktiven Zentrum 35

1. Begriff des Hemmzentrums 35

2. Modifizierung von Inhibitoren 35

a) Allgemeines 35

b) Modifizierung des spezifischen Trypsininhibitors 36

D. Zusammenfassung 39

E. Material und Methoden 41

I. Material 41

1. Enzyme 41

2. Substrate 41

3. Weitere Reagentien 41

II. Methoden 42

1. Aktivitätsbestimmung der Proteinasen 42

a) Trypsin 42

b) Chymotrypsin 42

c) Kallikrein 42

d) Plasmin 43

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität 43

3. Gewinnung der Rohextrakte 44

a) Homogenatherstellung 44

b) Enteiweißung 44

aa) mit Perchlorsäure 44

bb) durch Gelfiltration 45

c) Einengung 45

d) Entsalzung 45

4. Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex C-25 45

5. Spezifische Aktivität 46

6. Charakterisierung 46

a) Endgruppen 46

b) Aminosäurezusammensetzung 47

7. Untersuchungen am reaktiven Zentrum 48

a) Modifizierung von Lysylresten 48

b) Modifizierung von Arginylresten 49

c) Versuche mit Carboxypeptidase B 49

F. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 50

G. Literaturverzeichnis 51

A. EINLEITUNG UND THEMA

Die in pflanzlichen und tierischen Geweben und Sekreten vorkommenden Hemmkörper für proteolytische Enzyme stellen Polypeptide, Proteine und Glykoproteide dar. Die weite Verbreitung der bisher fast nur für Proteinasen nachgewiesenen Inhibitoren läßt eine enorme physiologische Bedeutung vermuten.

Der Hemmvorgang beruht auf der Bildung eines reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes, wobei das aktive Zentrum des Enzyms derart beeinflußt wird, daß die Spaltung von Substraten mehr oder weniger vollständig verhindert wird.

Verschiedene Gründe haben in den letzten Jahrzehnten das rege Interesse an dieser Stoffklasse geweckt: Mit Hilfe der Inhibitoren läßt sich ein weiterer Einblick in die Kinetik und den Bau der Enzyme gewinnen. Durch relativ einfache Reindarstellung und niedrige Molekulargewichte sind die Inhibitoren dafür gut geeignet. Für medizinische Belange eröffnen sich mit den Proteinaseninhibitoren umfangreiche therapeutische Möglichkeiten bei pathologischen Geschehnissen, die mit der unphysiologischen Aktivierung von proteolytischen Enzymen einhergehen: Pankreatitis, Schock und Störungen der Blutgerinnung.

Ziel der vorliegenden, im Arbeitskreis von WERLE und FRITZ durchgeführten Arbeit, waren Isolierung, Charakterisierung und Identifizierung des reaktiven Zentrums der in den Samenblasen des Meerschweinchens vorkommenden Proteinaseninhibitoren.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Wirkungsweise der Proteinaseninhibitoren

1. Spezifität

Je nachdem, wie viele proteolytische Enzyme ein Inhibitor zu hemmen vermag, bezeichnet man diesen als spezifisch, wenn er nur ein einziges, als polyvalent, wenn er zwei und mehr Enzyme zu hemmen in der Lage ist.

Die Blockierung der Enzyme erfolgt durch Bindung ihres aktiven Zentrums an das reaktive Zentrum der Inhibitoren. Diese Art von Hemmung bezeichnet man als kompetitive Hemmung. Inhibitor- und Substratkonzentration und relative Affinität des Enzyms zum Inhibitor bzw. Substrat bestimmen den Grad der Hemmung.

Erfolgt die Anlagerung des Inhibitors an das Enzym nicht am aktiven Zentrum, so wird das Enzymmolekül direkt beeinflußt; man spricht in diesem Falle von nicht kompetitiver Hemmung. Hierbei ist der Hemmgrad nur von der Konzentration des Inhibitors und von der Affinität des Inhibitors zum Enzym abhängig.

Beide Arten der Hemmung müssen bei den natürlich vorkommenden Proteinaseninhibitoren in Betracht gezogen werden (49, 30,28).

2. Reaktives Zentrum

Soweit bisher bekannt, gibt es zwei Arten von Trypsininhibitoren, nämlich sogenannte Lysin- und Arginininhibitoren. Durch chemische Modifizierung der Lysyl- bzw. Arginylreste läßt sich die Hemmkapazität reduzieren oder vollständig aufheben. Für die Spezifität und die Ausbildung einer Bindung zum Trypsinmolekül ist wahrscheinlich ein bestimmter Arginyl- bzw. Lysylrest verantwortlich. Polyvalente Inhibitoren können verschiedene reaktive Zentren für die einzelnen Proteinasen besitzen.

3. Reaktionsmechanismus

LASKOWSKI formulierte die Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor folgendermaßen (51,52,38):

$$T + I \rightleftharpoons L \rightleftharpoons C \rightleftharpoons L' \rightleftharpoons T + I'$$

T = Trypsin
I = nicht modifizierter Inhibitor
L = lockerer Komplex von Trypsin mit nicht modifiziertem Inhibitor
C = stabiler Komplex
L'= lockerer Komplex von Trypsin mit modifiziertem Inhibitor
I'= modifizierter Inhibitor

4. Temporäre Hemmung

LASKOWSKI und WU führten den Begriff der temporären Hemmung ein (48). Diese Hemmung auf Zeit beruht auf dem Zerfall des

Trypsin-Inhibitor-Komplexes nach längerer Inkubation in Trypsin und tryptische Spaltprodukte. Das Phänomen der temporären Hemmung zeigen alle Inhibitoren aus tierischen Organen mit Molekulargewichten unter 12 000 außer dem polyvalenten KUNITZ-Inhibitor aus Rinderorganen (48,20,8,76).

Der tryptische Abbau des Inhibitors erfolgt wahrscheinlich durch Angreifen eines freien Trypsinmoleküls am TI-Komplex oder durch Spaltung durch das im Komplex gebundene Trypsin, je nachdem,ob Trypsin oder Inhibitor im Überschuß vorhanden ist.

II. Isolierungsverfahren

1. Die Isolierung mittels fraktionierter Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Elektrophorese ist aufwendig und zeitraubend.

   Einfacher und spezifischer ist die Isolierung durch Komplexbildung mit Proteinasen, wiederholtes Aussalzen und anschließende Fällung des Trypsins mit Trichloressigsäure (43).

2. FRITZ und Mitarbeiter fanden, daß der bei Zugabe von Inhibitorlösung zu wasserunlöslichem Trypsinharz entstehende Trypsin-Inhibitor-Komplex in saurer Lösung in seine Komponenten dissoziiert. Komplexbildung und Dissoziierung durch Verschiebung des pH-Wertes erfolgen in beliebig oft reproduzierbarer Weise (18,21). Das Verfahren zeichnet sich durch einfache Durchführbarkeit, große Spezifität und gute Ausbeuten aus (25,23).

III. Physiologische Bedeutung und kurze Übersicht über die wichtigsten Inhibitoren

1. Bedeutung

Über diese ist bislang nichts Definitives bekannt.

Es wird vermutet, daß die pflanzlichen Inhibitoren im proteolytischen Enzymsystem der Pflanzen Steuerungsfunktionen ausüben. Ferner sollen sie pflanzliche Gewebe vor dem Überwuchern mit symbiontischen Bakterien und vor deren Proteinasen bewahren (77).

Die Inhibitoren des Pankreas sollen die Aktivierung von Zymogenen nach Ausfall der zellulären Schutzmechanismen im Verlaufe entzündlicher Erkrankungen des Pankreas verhindern (77). Die Funktion des Inhibitors aus Gl. submandibularis der Caniden und Feliden wird im Bereich der Drüse, der Mundhöhle oder des Oesophagus gesucht, da er durch Pepsin abgebaut wird. Eventuell kommt auch hier ein Schutz vor mit der Nahrung aufgenommenen Bakterienproteinasen in Betracht (77). Seruminhibitoren dürften am Mechanismus der Blutgerinnung beteiligt sein. Einen Schutzmechanismus während der Bebrütung stellen wahrscheinlich die Inhibitoren des Eiklar dar (77). Aufgabe der Inhibitoren im Colostrum könnte es sein, die mit diesem aufgenommenen mütterlichen Immunkörper bei der Dünndarmpassage vor dem tryptischen Abbau zu verschonen und ihre Resorption in unversehrtem Zustand zu ermöglichen (50,78).

2. Übersicht

Eine umfassende Übersicht über die bislang bekannten Proteinaseninhibitoren gibt die Monographie von VOGEL, TRAUT-

SCHOLD und WERLE (77). Im Folgenden seien die wichtigsten Inhibitoren pflanzlichen und tierischen Ursprungs kurz dargestellt.

a) Pflanzliche Inhibitoren

Der am längsten bekannte pflanzliche Inhibitor ist jener aus Sojabohnen, der 1944 entdeckt wurde (34,7). Der säureinstabile und hitzeempfindliche Inhibitor hat ein Molekulargewicht von 21 000 - 24 000 (44,70). Das Hemmspektrum umfaßt Trypsin, Chymotrypsin, Serumkallikrein und Plasmin (45,46,84,81,53). Eine Vielfalt weiterer Inhibitoren findet sich in anderen Leguminosen (66,40,47), Getreidearten (6,65) und Rüben (77).

WERLE wies erstmals die Hemmung der blutdrucksenkenden Wirkung von Kallikrein durch Kartoffelextrakte nach (79, 80). Der trypsin- und chymotrypsinhemmende Anteil der Kartoffelinhibitoren ist säurestabil und hitzebeständig (62). Es werden durch Kartoffelextrakte weiterhin Plasmin (57) und alle Organkallikreine (79,80,81) gehemmt.

b) Tierische Inhibitoren

Der polyvalente Inhibitor aus Rinderorganen hat breiten Eingang in die Therapie gefunden. Er wurde zunächst in Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes als Hemmkörper für Kallikrein festgestellt (5,42). Später wies KUNITZ (43) einen Trypsininhibitor im Pankreas des Rindes nach, während ASTRUP (3) einen Hemmstoff der Fibrinolyse in der Rinderlunge fand. Nach neueren Untersuchungen sind diese Inhibitoren identisch oder unterscheiden sich nur unwesentlich (1,2). Der polyvalente Rinderinhibitor stellt ein basisches Polypeptid mit dem Molekulargewicht 6 500 dar. Das Hemmspektrum ist sehr ausgedehnt und umfaßt alle

Organkallikreine, Serumkallikrein, Trypsin, Chymotrypsin A und B, Plasmin, Papain und Pronase (75).

KAZAL beschrieb 1948 einen im Rinderpankreas vorkommenden spezifischen Trypsininhibitor (39). FRITZ, TRAUTSCHOLD und WERLE wiesen spezifische Trypsininhibitoren im Pankreasgewebe bzw. -sekret verschiedener Säugetiere und des Menschen nach (16,17,18,19,22).

TRAUTSCHOLD und Mitarbeiter fanden in der Gl. sublingualis und submandibularis einen Inhibitor für Trypsin, Chymotrypsin und Papain (72,74). Die Inhibitorkonzentration in diesen Drüsen von 10 000 mIU/g wird durch die anderer Gewebe nicht annähernd erreicht.

Bezüglich der Inhibitoren aus Serum, Harn, Eiklar, Colostrum, Milch und Ascaris lumbricoides suum sei nochmals auf die Monographie von VOGEL, TRAUTSCHOLD und WERLE (77) hingewiesen.

HAENDLE und Mitarbeiter fanden im Sperma von Mensch, Rind und Schwein und in Samenblasenhomogenaten von Mensch, Rind, Schwein, Schaf, Ratte, Maus, Meerschweinchen und Hamster beachtliche Hemmkapazitäten für Trypsin (32,33). Trypsininhibitoren sind auch in Hoden und Nebenhoden der untersuchten Spezies vorhanden, jedoch in weitaus geringerer Konzentration.

Die Abhängigkeit der Inhibitorbildung in Sexualorganen von Sexualhormonen zeigte HAENDLE (33) im Tierversuch. Durch Verabreichung von Testosteron nimmt die Inhibitormenge zunächst gemäß der Gewichtszunahme der Samenblasen zu, während anschließend die Inhibitorkonzentration höher wird. Denselben Effekt zeigte Choriongonadotropin.

Spezies	Hoden	Nebenhoden	Samenbl.	Sperma
Mensch	70-100	50- 80	50- 100	150- 330
Rind	40- 70	50- 80	900-1500	2400-3100
Schwein	90-120	70-110	500-1000	800-1200
Schaf	-	-	250- 500	-
Ratte	100-200	90-130	1400-1600	-
Maus	90-130	100-200	2200-2700	-
Meerschw.	100-220	300-400	3500-5000	-
Hamster	60- 90	80-120	300- 600	-

Tab. 1: Gehalt der Sexualorgane und deren Sekrete an Trypsininhibitoren in mIU/g bzw. ml (33).

Über die physiologische Bedeutung der Inhibitoren im Sperma und in den Samenblasen der untersuchten Spezies kann noch nichts Endgültiges ausgesagt werden.

Wie STAMBAUGH und BUCKLEY zeigten, erfolgt die Durchdringung der zona pellucida des Eies vor der Befruchtung auf enzymatischer Basis (68,69). Die dazu erforderlichen Enzyme, Hyaluronidase und vor allem ein trypsinähnliches Enzym, sind von den Autoren als Komplex mit einem Molekulargewicht von 59 000 aus Spermienextrakten isoliert worden. In vitro kann die Auflösung der zona pellucida durch Zugabe von Trypsininhibitor aus Soja- oder Limabohnen verhindert werden (68,69). An Kanincheneiern konnte HAENDLE nachweisen, daß die Auflösung der zona pellucida durch Proteinasen der Akrosomen ausbleibt, wenn Trypsininhibitor aus Humansperma oder Meerschweinchensamenblasen zugefügt wird (33).

Die Annahme, bei dem Inhibitor handle es sich um den im Samenplasma vorkommenden Dekapazitationsfaktor, kann nicht mehr aufrechterhalten werden (85). Dieser Faktor, der

kapazitierte - also befruchtungsfähige - Spermien wieder dekapazitiert, ist von ZANEVELD, SRIVASTAVA und WILLIAMS isoliert worden (85). Er zeigt keine Hemmwirkung gegenüber Trypsin. Ferner verhindert der Dekapazitationsfaktor die Durchdringung der zona radiata, während der Trypsininhibitor aus Samenblasen dazu nicht in der Lage ist. Bei dem Dekapazitationsfaktor, der ein Molekulargewicht von 500 hat, handelt es sich wahrscheinlich nicnt um ein Polypeptid.

Vermutlich ist der Inhibitor an der Dekapazitation mitbeteiligt. Schutz der Schleimhäute der inneren weiblichen Genitalorgane (61) und der Spermien voreinander, sowie eine Beteiligung im Gerinnungssystem des Sperma werden diskutiert.

IV. Proteinaseninhibitoren in der Therapie

1. Proteinaseninhibitoren im Schock

In der Schocktherapie besitzt der Inhibitor aus Rinderorganen große Bedeutung.

WERLE, FORELL und MEYER (82,14,15) beobachteten, daß der Blutdruckabfall bei Schockpatienten und im Tierversuch mit einer Kininogenverminderung im Blut einhergeht, da durch verschiedene Noxen aktivierte Kininogenasen aus diesen Kinine freisetzen. Diese stark gefäßaktiven Polypeptide wirken blutdrucksenkend. Je nach dem Umfang der Kininfreisetzung kann der Blutdruckabfall zum Schock führen. Die Erhöhung der Gefäßpermeabilität kann zusätzlich zu Oedemen und Haemorrhagien führen, wodurch das Schockgeschehen potenziert wird.

Der Verlauf bestimmter Schockformen konnte durch Gabe des Inhibitors aus Rinderorganen günstig beeinflußt werden (58,4). Der therapeutische Effekt beruht auf der Hemmung der Kininogenasen. Sicher ist der über das Kininsystem ablaufende Schockmechanismus nicht der einzige, da sonst bei allen Schockformen mit Proteinaseninhibitoren günstige therapeutische Wirkungen zu erwarten wären.

2. Inhibitoren und Pankreatitis

Grundgedanke bei der Einführung des Inhibitors aus Rinderorganen in die Therapie war es, die Trypsinwirkung bei vorzeitiger Zymogenaktivierung im Verlauf entzündlicher Reaktionen des Pankreas einzudämmen. Da im nekrotischen Pankreas und nach Autolyse von Pankreasgewebe bisher kein aktives Trypsin nachgewiesen werden konnte (64,10), ist die Annahme einer primären Trypsinogenaktivierung noch strittig. Zudem ruft ins Pankreas injiziertes Trypsin die Erscheinungen einer Pankreatitis nicht hervor. Dies jedoch schließt eine primäre Trypsinogenaktivierung nicht aus. Bei der Autolyse des Pankreas in vitro konnte die Proteolyse zwar nicht verhindert, wohl aber eingeschränkt werden (73).

Der Hauptangriffspunkt des Trasylols liegt in der Hemmung der durch die Entzündungsvorgänge in unspezifischer Weise aktivierten Kininogenasen des Serums, welche aus den reaktiv vermehrten Kininogenen lokal Kinine freisetzen (82, 14). Diese sind ihrer gefäßpermeabilitätserhöhenden und kapillarerweiternden Wirkung wegen für den bei der akuten Pankreatitis auftretenden Kreislaufkollaps verantwortlich (71,63).

3. Inhibitoren und Blutgerinnung

MARX und WERLE schlugen den Rinderinhibitor wegen seiner sehr guten plasminhemmenden Wirkung und Verträglichkeit als Therapeutikum bei Hyperfibrinolyse vor (54,55). Diese ist Folge einer Störung des Plasmin-Inhibitor-Gleichgewichts bei ausgedehnten Traumen, chirurgischen Eingriffen, in der Geburtshilfe usw. Der Inhibitor begünstigt auch die Blutstillung, die bei Hypofibrinogenämie gestört ist (56).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

I. Reindarstellung der Inhibitoren aus Samenblasen von Meerschweinchen

1. Extraktgewinnung

In vier Aufarbeitungen wurden je 500-600 Gramm Samenblasen mit deionisiertem Wasser homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Inhibitorkonzentration in den Überständen wurde gemessen. Nach viermaligem Wiederholen dieser Behandlung sank die Konzentration nicht mehr nennenswert stark ab.

Überstand	Inhibitorkonzentration in mIU/ml			
in ml	A I	A II	A III	A IV
1500	460	810	435	715
500	380	520	225	425
500	130	235	165	130
500	105	190	120	90
500	75	125	95	90

Tab. 2: Inhibitorkonzentrationen in den Überständen bei Behandlung mit deion. Wasser (A = Aufarbeitung)

Die Sedimente wurden anschließend mit 3 %iger Perchlorsäure aufgenommen, homogenisiert und zentrifugiert. Die Inhibitorkonzentration in den Überständen nahm sehr schnell ab.

Überstand in ml	Inhibitorkonzentration in mIU/ml A I	A II	A III	A IV
500	500	535	480	640
500	165	105	85	105
500	70	40	75	65
500	30	20	40	45

Tab. 3: Behandlung der Sedimente mit 3 %iger Perchlorsäure

Bei diesem Schritt konnte etwa ein Viertel der Gesamtausbeute an Inhibitor gewonnen werden.

Behandlung mit	A I mIU	A II mIU	A III mIU	A IV mIU
deion. Wasser	1 035 000	1 750 000	955 000	1 440 000
3 %iger Perchlorsre.	382 500	350 000	340 000	427 500

Behandlung mit	A I %	A II %	A III %	A IV %
deion. Wasser	73	80	73	77
3 %iger Perchlorsre.	27	20	27	23

Tab. 4 u. 5: Gesamtausbeuten bei den ersten zwei Behandlungsschritten in mIU und Prozent

HAENDLE gibt einen Inhibitorgehalt von 3 500 - 5 000 mIU pro Gramm Frischgewebe an (33). Zwar erzielten wir im

Durchschnitt nicht derart hohe Kapazitäten, doch stimmen sie in ihrer Größenordnung mit der angegebenen gut überein.

Aufarbeitung	Menge der Samenbl. in g	Inhibitor-menge	Inhibitorgeh. pro Gramm
A I	521	1 417 500	2 720
A II	560	2 100 000	3 750
A III	507	1 295 000	2 550
A IV	580	1 867 500	3 220

Tab. 6: Inhibitorgehalt pro Gramm Gewebe bei vier Aufarbeitungen.

Bei diesen Angaben ist zu berücksichtigen, daß die Rohextrakte stark getrübt und daher wegen Verfälschung des Hemmtestes genaue Messungen des Inhibitorgehaltes nicht möglich sind.

2. Enteiweißung der Extrakte

Die Abtrennung hochmolekularer Fremdproteine wurde auf zweierlei Arten durchgeführt.

a) Bei Behandlung der Extrakte mit gleichem Volumen 6 %iger Perchlorsäure traten Inhibitorverluste von etwa 50 % auf. Durch Aufnehmen der abzentrifugierten Proteinsedimente mit 3 %iger Perchlorsäure konnten etwa 20 % der verlorenen Aktivität zurückgewonnen werden, so daß die tatsächlichen Verluste bei etwa 40 % der Ausgangsmenge lagen.

Aktivität vorher	Verlust nach Perchlorsre. mIU	%	Zurückgewonnen mIU	%	Tatsächlicher Verlust mIU	%
1 035 000	476 100	46	80 940	17	395 160	38
1 750 000	962 500	55	231 000	24	731 500	41

Tab. 7: Verluste durch Perchlorsäure-Enteiweißung

Die Neutralisation der perchlorsauren Extrakte wurde mit Kaliumhydrogencarbonat durchgeführt.

b) Die Verluste bei der Enteiweißung konnten mittels Gelfiltration beträchtlich eingeschränkt werden. Die Rohextrakte wurden nach Einengung über Sephadex G-75 und G-50 medium gegeben. Hierbei gingen etwa 20 % der Ausgangsaktivität verloren.

Aktivität vorher	Verlust nach G-75 mIU	%	Verlust nach G-50 mIU	%	Gesamtverlust mIU	%
955 000	114 600	12	47 700	5	162 300	17
1 440 000	244 800	17	115 200	8	360 000	25

Tab. 8: Verluste bei Enteiweißung durch Gelfiltration

3. Filtration an Sephadex G-25

Vor der präparativen Auftrennung der Inhibitoren an SE-Sephadex wurden die enteiweißten und eingeengten Extrakte an Sephadex G-25 entsalzt. Mit diesem Schritt war, wie später gezeigt wird, auch eine weitere Reinigung von Fremdprotein verbunden. Die Verluste lagen bei etwa 5 %.

Aufgetragene Inhibitormenge in mIU	Verluste in mIU	%
1 132 700	56 700	5
1 507 500	105 500	7

Tab. 9: Verluste bei der Entsalzung über Sephadex G-25

4. Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex C-25

Nach Lyophilisation des entsalzten Inhibitors wird dieser in einer geringen Menge deionisierten Wassers, die etwa 5 % des Volumens der Ionenaustauschersäule entspricht, gelöst und zur präparativen Auftrennung über SE-Sephadex C-25 gegeben. Zur Elution erwies sich ein linearer Ammoniumacetat-Konzentrationsgradient bei einem pH von 5,4 als geeignet. Mit dem Anfangspuffer (0,02 M) wurde trüber Vorlauf ausgewaschen, der etwa 10 % der aufgetragenen Inhibitormenge enthielt. Vermutlich handelte es sich dabei um Fremdprotein mit adsorbiertem Inhibitor.

Innerhalb des Gradienten von 0,02 - 0,2 M traten inhibitorisch aktive Bereiche auf, die insgesamt etwa 70 % der aufgetragenen Gesamtmenge entsprachen. Die zweite Hauptfraktion wurde bei 0,2 - 0,4 M eluiert. Sie enthielt etwa 20 % der gesamten Aktivität. Beide Fraktionen waren nicht einheitlich.

Aufgetragene Inhibitormenge	Vorlauf		Fraktion I		Fraktion II	
	mIU	%	mIU	%	mIU	%
2 756 000	253 000	9	1 880 000	68	623 000	23

Tab. 10: Verteilung der Inhibitoren nach Auftrennung an SE-Sephadex

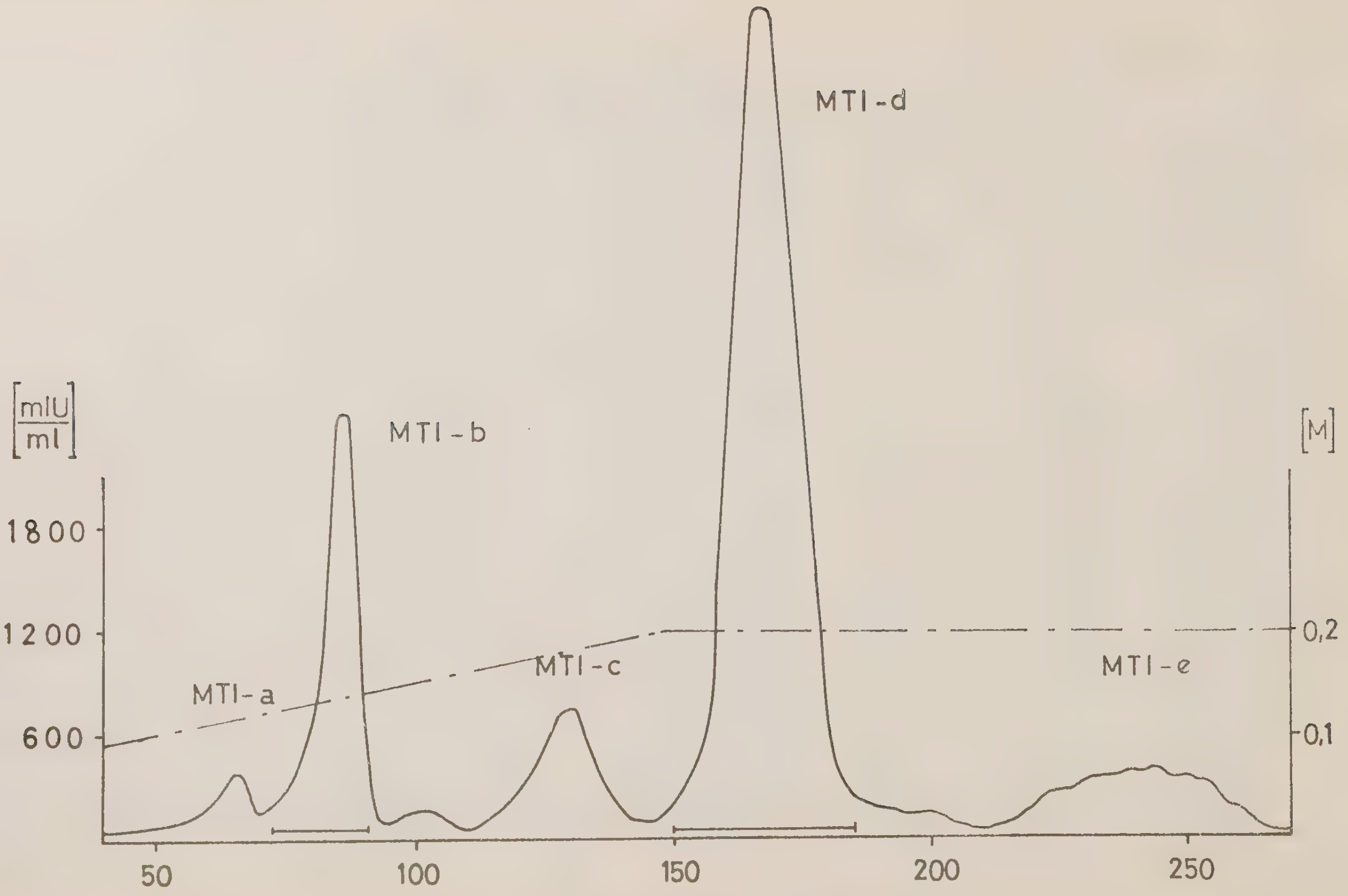
Diese Verteilung der Inhibitoren lag völlig anders, als nach früheren Aufarbeitungen von FINK (11) zu erwarten war. Er fand in Fraktion I ca. 25 %, in Fraktion II ca. 65 % der Gesamtaktivität.

Dies ist, wie Untersuchungen ergaben, darauf zurückzuführen, daß bei der Eiweißfällung mit Perchlorsäure die antitryptische, nicht jedoch die Antiplasminaktivität absinkt.

Der in Meerschweinchensamenblasen enthaltene spezifische Trypsin-Inhibitor ist in Fraktion I, der Trypsin-Plasmin-Inhibitor in Fraktion II enthalten (siehe Charakterisierung).

Bei der Behandlung mit Perchlorsäure wird der Trypsin-Inhibitor zu einem großen Teil ausgefällt. Der Verlust bei der Isolierung mit Trypsinharz, die von FINK (11) durchgeführt wurde, geht sicher ebenfalls zu Lasten des Trypsin-Inhibitors. Aus den angeführten Gründen überwiegt bei Säurebehandlung und Isolierung mit Trypsinharz der Trypsin-Plasmin-Inhibitor (MTPI). Bei Vermeidung dieser Schritte wird die Verteilung zugunsten des Trypsin-Inhibitors (MTI) verschoben (Tab. 10).

Nach Entsalzung und Gefriertrocknung der beiden Hauptfraktionen wurden diese an SE-Sephadex C-25 rechromatographiert. Hierbei wurde Fraktion I (MTI) in zwei Hauptkomponenten, Fraktion II (MTPI) in fünf Komponenten aufgetrennt (Abb. 1 u. 2).



[mIU/ml]
1800
1200
600
[M]
0,2
0,1
50
100
150
200
250
MTI-a
MTI-b
MTI-c
MTI-d
MTI-e

Abb. 1: Rechromatographie von Fraktion I (MTI) an SE-Sephadex C-25
Ordinate links: Inhibitorkonzentration in den Fraktionen
Ordinate rechts: Pufferkonzentration in Mol
Abszisse: Nummern der Fraktionen

Bedingungen: SE-Sephadex C-25 (Säule 1,8 x 140 cm) wurde mit dem Anfangspuffer (0,02 M Ammoniumacetat) äquilibriert. Aufgetragen wurden 1 880 IU von Fraktion I (MTI). Die Elution erfolgte mit einem linearen Ammoniumacetat - Konzentrationsgradienten von 0,02 - 0,2 M bei einem pH von 5,4. Es wurden je 1 100 ml Puffer eingesetzt. Die Elutionsgeschwindigkeit lag bei 10 cm/h.

Die Hauptkomponenten des MTI, ihrem zeitlichen Auftreten bei der Elution nach MTI-b und MTI-d genannt, wurden nochmals an SE-Sephadex C-25 rechromatographiert. MTI-b enthielt etwa 19 %, MTI-d etwa 62 % der Gesamtaktivität des MTI. Der Rest entfiel auf die Zwischenfraktionen.

MTI in IU	MTI-b		MTI-d	
	IU	%	IU	%
1 880	363	19	1156	62

Tab. 11: Anteile der Komponenten bei Rechromatographie von MTI an SE-Sephadex

Die Rechromatographie der einzelnen Komponenten des MTPI wurde wegen seines geringen Anteils und der schwierigen Materialbeschaffung nicht durchgeführt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Hemmaktivität gegenüber Trypsin nicht an ein einheitliches Protein gebunden ist, sondern daß mehrere deutlich unterscheidbare Komponenten vorhanden sind.

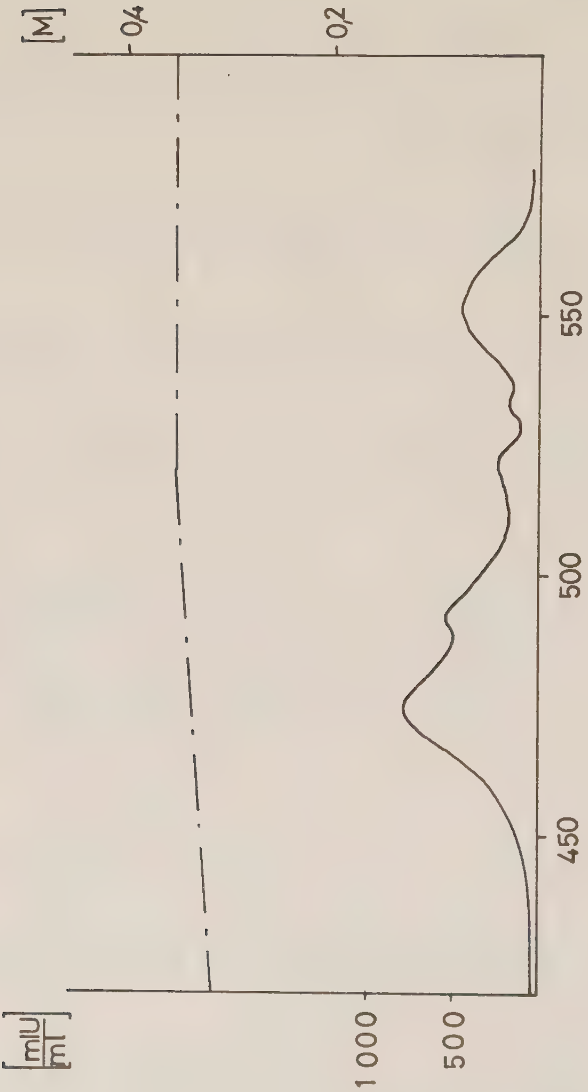


Abb. 2: Rechromatographie von Fraktion II (MTPI) an SE-Sephadex. Gradient von 0,2 - 0,35 M. Sonstige Bedingungen und Bezeichnungen siehe Abb. 1

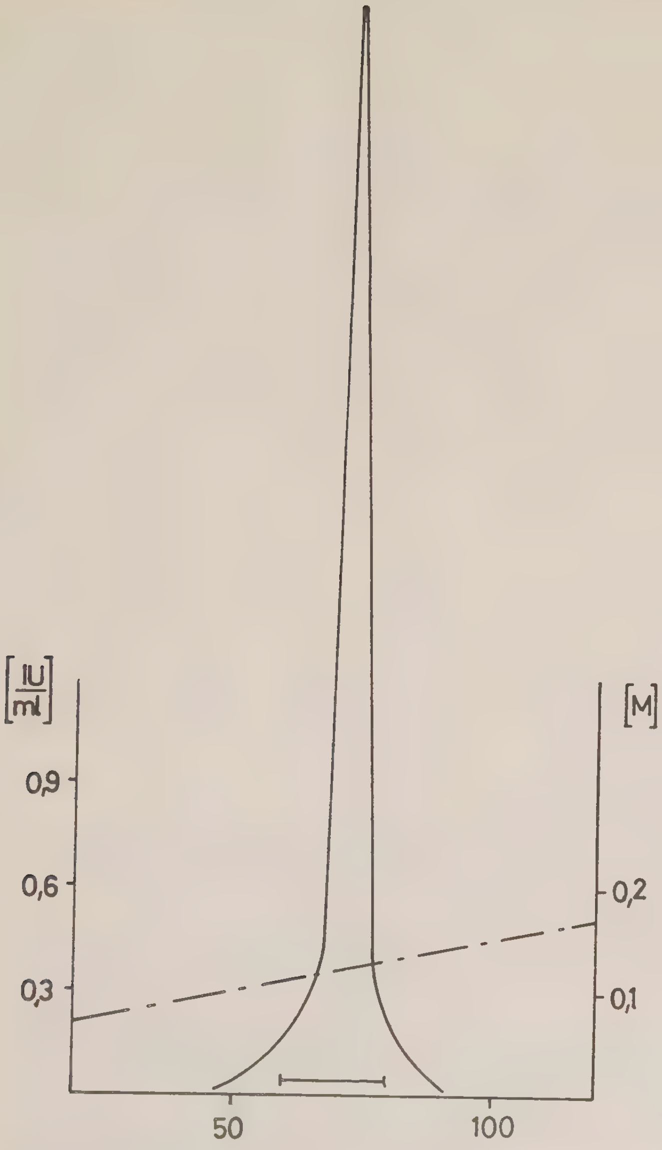


Abb. 3: Rechromatographie von MTI-b. Bedingungen und Bezeichnungen siehe Abb. 1

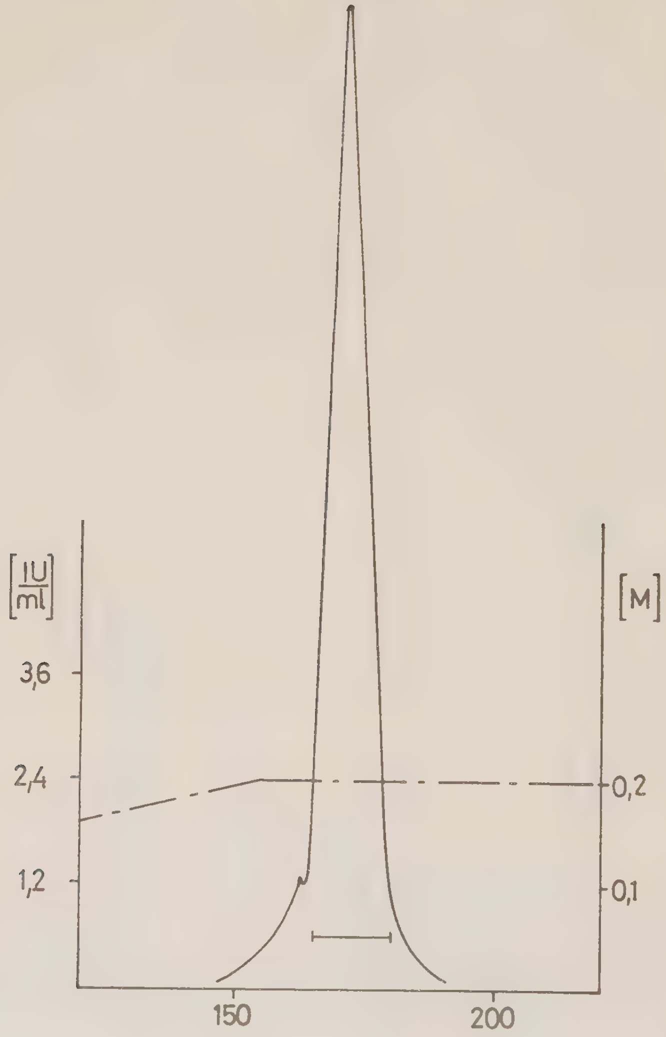


Abb. 4: Rechromatographie von MTI-d. Bedingungen und Bezeichnungen siehe Abb. 1

5. Spezifische Aktivität

Die folgende Tabelle gibt das Verhalten der spezifischen Aktivität nach den einzelnen Reinigungsschritten an. Bei den Extrakten wurde sie durch die Biuretprobe bestimmt, nach der Ionenaustauschchromatographie durch genaue Einwaage des lyophilisierten Inhibitors und mehrmaliges Austesten verschiedener Mengen geeigneter Verdünnungen.

Reinigungsschritt	spez. Aktivität µg Protein/mIU	Ausbeute %	Anreicherg.
wässriger Extrakt	55	100	0
enteiweißter Extrakt (G 75 u.G 50)	8,5	84	6,5
Filtration an G 25	4,0	79	13,8
Ionenaustauschchromatographie (SE-Sephadex)	0,43	54 MTI 18 MTPI	127,9
Rechromatographie	0,32	11 MTI-b 34 MTI-d	171,8

Tab. 12: Darstellung der spez. Aktivität und der Ausbeuten nach den einzelnen Reinigungsschritten

Die für den spezifischen Trypsin-Inhibitor erreichte spezifische Aktivität betrug 0,32 µg Protein/mIU bzw. 3 100 mIU/mg und lag damit etwas über der bei der Isolierung mit Trypsinharz erhaltenen (41). Der Inhibitor konnte, ausgehend vom wässrigen Extrakt, etwa 172fach angereichert werden.

II. Charakterisierung

1. Hemmverhalten

a) Hemmspektrum

Der Inhibitor hemmt Trypsin und Plasmin. Trypsinhemmaktivität ist in Fraktion I (MTI) und Fraktion II (MTPI) enthalten, während die Hemmwirkung gegenüber Plasmin streng an Fraktion II gebunden ist.

Die Feststellung einer eventuellen Hemmfähigkeit gegenüber anderen Proteinasen wurde mittels der im Abschnitt Methoden genannten Hemmtests getroffen. Als Substrat bei der Bestimmung der Trypsin- und Plasminhemmung wurde BAPNA verwendet.

Proteinasen	MTI	MTPI
Trypsin	+	+
Chymotrypsin	–	–
Plasmin	–	+
Thrombin	–	–
Kallikreine	–	–

Tab. 13: Hemmspektrum der Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen

b) Hemmkurven

Es wurde eine bestimmte Menge Trypsin vorgelegt und nach Zugabe variierender Inhibitormengen die tryptische Restaktivität gemessen. Die Inkubationszeit für die Komplexbildung betrug jeweils fünf Minuten. Substrat war Nα-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid.

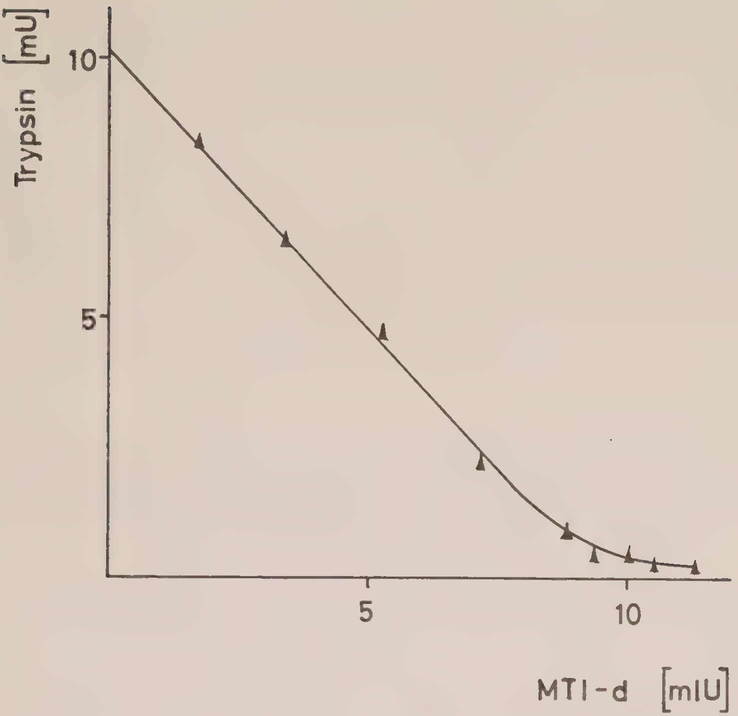


Abb. 5: Trypsin-Hemmkurve mit MTI-d (ohne Säurebehandlung und Harz isoliert)
Abszisse: Inhibitormenge
Ordinate: Tryptische Restaktivität

Aus Abb. 5 und 6 ist ersichtlich, daß eine Linearität zwischen dem Ausmaß der Trypsinhemmung und der Inhibitorkonzentration besteht. Bei dem ohne Trypsinharz isolierten MTI-d ist dies bis zu einer Hemmung von etwa 87 % der Fall, beim mit Harz isolierten bis zu 83 %.

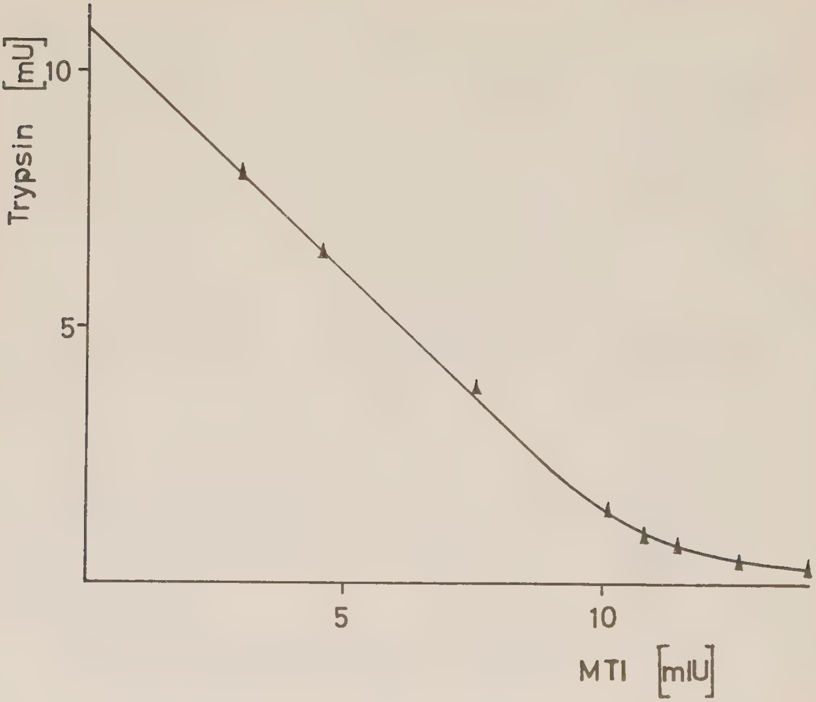


Abb. 6: Trypsin-Hemmkurve mit MTI (mit Trypsinharz isoliert)

Die in den Hemmkurven auftretenden Unterschiede dürften auf die Spaltung der Arg-X-Bindung im reaktiven Zentrum des mit Trypsinharz isolierten Inhibitors zurückzuführen sein (siehe Untersuchungen am reaktiven Zentrum).

c) Temporäre Hemmung

MTI und MTPI zeigen das Phänomen der temporären Hemmung.

MTI wird bei Inkubation mit Trypsin bereits in 48 min. zu 50 % inaktiviert, MTPI jedoch erst in 23 h (11).

2. Bestimmung der Endgruppen

Nach der Methode von GRAY (29) wurden die lyophilisierten Inhibitorfraktionen mit Dansyl-Chlorid umgesetzt. Die Ermittlung der markierten Aminosäuren erfolgte nach der Hydrolyse durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidschichten (83).

Unabhängig davon, ob der Inhibitor mit oder ohne Trypsinharz isoliert wurde, ergab sich für alle Komponenten des MTI (spezifischer Trypsin-Inhibitor) Glutamin oder Glutaminsäure als N-terminale Gruppe.

Bei der Bestimmung der N-terminalen Gruppen des mit Trypsinharz isolierten MTPI wurde nur eine Fraktion als einheitliches Protein ausgewiesen. Der N-Terminus war Val. Für zwei weitere Fraktionen wurden je zwei N-terminale Gruppen gefunden, nämlich Phe und Ala bzw. Ser und Lys (11). Die beiden Fraktionen bestehen also aus je zwei Komponenten.

3. Aminosäurezusammensetzung

Die Proben wurden 20 und 120 h, sowie nach Oxydation mit Perameisensäure 20 h in 6 N HCl bei 110° C hydrolysiert und mit dem Aminosäureanalysator "Unichrom" der Fa. Beckman analysiert.

Aminos.	MTI-b Hydrolysenzeit 20 h	120 h	AS pro Mol	MTI-d Hydrolysenzeit 20 h	120 h	AS pro Mol
$CysSO_3H$	3,44[a]			3,96[a]		
$MetO_2$	0,35[a]			0,33[a]		
Asp	6,03	6,11	6	5,00	5,01	5
Thr	1,82	1,70	2	1,06	1,01	1
Ser	6,63	5,17	7	2,89	2,41	3
Glu	16,93	16,66	17	9,43	9,39	9
Pro	5,58	5,19	5-6	4,16	4,00	4
Gly	8,01	7,98	8	5,27	5,56	5
Ala	1,97	1,93	2	1,13	1,39	1
Cys	3,13	1,40	6[b]	3,85	4,59	6[b]
Val	5,47	6,97	7	2,39	3,49	3
Met			0			0
Ile	3,06	3,57	3-4	2,20	3,00	3
Leu	4,76	4,13	4-5	3,71	3,90	4
Tyr	1,19	0,95	1	1,33	1,13	1
Phe	0,96	1,08	1	0,29	0,28	0
Lys	4,88	5,06	5	2,07	2,20	2
His	5,10	5,12	5	2,52	2,58	2-3
Arg	9,19	9,01	9	5,78	6,16	6
Trp	0,20[c]		0	0,20[c]		0
Summe			88-91			55-56
Molekulargewicht[d]			9931-10254			6275-6412

Tab. 14: Aminosäureanalysenwerte von Fraktion b und d des spezifischen Trypsininhibitors aus Meerschweinchensamenblasen

[a] Nach Oxydation mit Perameisensäure bestimmt

[b] Der Wert 6 ergibt sich in Analogie zu dem der mit Trypsinharz isolierten Fraktionen, da auch

nach Oxydation mit Perameisensäure nur Werte zwischen 3 und 4 gefunden wurden

[c] Spektrophotometrisch bestimmt

[d] Diese Werte ergeben sich, wenn keine Amidierung vorliegt

III. Untersuchungen am reaktiven Zentrum

1. Begriff des Hemmzentrums

Die Hemmwirkung von Trypsininhibitoren beruht nicht auf unspezifischer Anlagerung des Inhibitors an das Enzym, sondern es ist ein reaktives Zentrum wesentlich dafür verantwortlich. Dieses stellt einen Lysyl- oder Arginylrest bzw. eine Peptidsequenz mit einem dieser Reste dar (12,13,35,36,37,60).

2. Modifizierung von Inhibitoren

Durch Modifizierung des Inhibitors aus Meerschweinchensamenblasen wurden Untersuchungen über dessen reaktives Zentrum angestellt.

a) Allgemeines

Durch Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid werden die $\varepsilon + \alpha$-Aminogruppen der Lysylreste reversibel acyliert. Durch saure Hydrolyse werden die Maleoylreste wieder abgespalten. Mit Butandion-(2,3)-Reagens (31) lassen sich spezifisch die Guanidinogruppen des Arginins modifizieren.

Lysininhibitoren verlieren nach Acylierung der ε-Aminogruppen ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin vollständig. Argininինhibitoren behalten nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid ihre gesamte Hemmaktivität gegen Trypsin, nach Umsetzung ihrer Polymaleoylderivate mit dem Butandion-(2,3)-Reagens jedoch verlieren sie bis auf eine geringe Restaktivität rasch ihre Hemmwirkung.

b) Modifizierung des MTI

Der mit Trypsinharz isolierte spezifische Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen verlor nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid etwa zwei Drittel seiner Hemmaktivität. Die verbleibende Aktivität verschwand rasch nach Zugabe von Butandion-(2,3)-Reagens (24).

Auf diese Ergebnisse hin vermutete man bei diesem Inhibitor ein Lysin- und ein Argininzentrum (24).

Durch Carboxypeptidase B wurde der mit Trypsinharz isolierte MTI fast vollständig inaktiviert (94 % Verlust an Hemmaktivität; Tab. 15), was darauf zurückzuführen war, daß die Lys-X- bzw. Arg-X-Bindung des reaktiven Zentrums bei der Reaktion mit dem Trypsinharz gespalten worden war (60).

Die Inaktivierung des Inhibitors verlief parallel zur Abspaltung von Arginin. Aus 1 µMol MTI-a (harzisoliert) wurden bei einem Verlust von 94 - 95 % an Hemmaktivität 0,9 µMol Arginin gegenüber 0,19 µMol Lysin freigesetzt (11).

Das ist ein Beweis dafür, daß der Inhibitor zur Gruppe der Argininինhibitoren gehört. Die starke Inaktivierung bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid beruht sicher auf der Acylierung der α-Aminogruppe der Aminosäure X an der Spaltstelle im reaktiven Zentrum.

Der ohne Trypsinharz isolierte Inhibitor verlor weder bei der Inkubation mit Carboxypeptidase B (Tab. 15), noch bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (Tab. 16) an Hemmaktivität gegenüber Trypsin. Bei der Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens wurde das Polymaleoylderivat des Inhibitors inaktiviert. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß der Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen zu den Argininhibitoren zu zählen ist.

	Inhibitorkonzentration im Ansatz in mIU	Restaktivität in %
MTI^H	1 206	5,0
	422	6,0
MTI	541	98
	541	94,1

Tab. 15: Restaktivität des MTI nach Inkubation mit Carboxypeptidase B (MTI^H = harzisolierter Inhibitor)

	Inhibitorkonz. im Ansatz in mIU	Maleinsäureanhydrid in mg	Restaktivität in %
MTI^H	2 450	10	32
	1 205	15	15,0
		+ 10	6,9
	724	20	9,0
		+ 10	6,2
MTI	752	20	104^x

Tab. 16: Restaktivität nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

[x]Die geringe Aktivitätszunahme ist vermutlich auf die Dissoziation von Polymeren zurückzuführen.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Samenblasen von Meerschweinchen wurden Inhibitoren für Trypsin und Plasmin isoliert. Um eine Modifizierung der Inhibitoren durch Trypsin zu verhindern, erfolgte die Isolierung ohne Verwendung von Trypsinharz.

Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex C-25 ermöglichte die Auftrennung in zwei Fraktionen. Die Komponenten der ersten Fraktion vermögen nur Trypsin, die der zweiten außer Trypsin auch Plasmin zu hemmen. Etwa 70 % der Inhibitormenge entfallen auf den spezifischen Trypsininhibitor (MTI), 20 % auf den Trypsin-Plasmin-Inhibitor (MTPI).

Nach Rechromatographie des MTI fanden sich in Komponente MTI-b ungefähr 19 %, in MTI-d 62 % der Inhibitoraktivität. Bezogen auf die gesamte Inhibitormenge in den Rohextrakten sind dies 11 % bzw. 34 %.

Ausgehend von den wässrigen Extrakten konnte der Hemmstoff etwa 172fach angereichert werden. Die erzielte spezifische Aktivität liegt bei 0,32 µg Protein/mIU.

Eine Linearität zwischen der Inhibitorkonzentration und dem Ausmaß der Hemmung besteht im Falle des MTI bis zu einer Hemmung von etwa 87 %. Die Hemmwirkung ist temporär.

N-terminale Gruppe des spezifischen Trypsininhibitors ist Glutamin oder Glutaminsäure. Der N-Terminus der ein-

heitlichen Komponente des Trypsin-Plasmin-Inhibitors ist Valin. Zwei weitere Komponenten haben je zwei N-terminale Gruppen: Phe und Ala bzw. Ser und Lys.

Im Gegensatz zu dem mit Trypsinharz isolierten wird der ohne diesen Behandlungsschritt gewonnene Trypsininhibitor durch Carboxypeptidase B nicht inaktiviert. Auch bei Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid bleibt seine inhibitorische Aktivität voll erhalten. Diese geht erst bei Zugabe von Butandion-(2,3)-Reagens verloren. Der spezifische Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen gehört somit zur Gruppe der Argininhibitoren.

E. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Enzyme

Trypsin (EC 3.4.4.4), Novo Industri, Kopenhagen, 23,5 AE/g, 4365 NF/mg, krist., lyophil.;
Chymotrypsin (EC 3.4.4.5), Novo Industri, Kopenhagen, 1100 NF/mg, krist., lyophil.;
Plasmin (EC 3.4.4.14), Novo Industri, Kopenhagen, 2,77 Novo-Einheiten/mg, lyophil.;
Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2);
Kallikrein (EC 3.4.4.21).

2. Substrate

Nα-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilia-hydrochlorid (BAPNA), Merck;
N-Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid (SUPHEPA), Mann Res. Lab., New York;
Nα-Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE), Merck.

3. Weitere Reagentien

Triäthanolamin-hydrochlorid (TRA), EGA-Chemie;
Maleinsäureanhydrid, Schuchardt;
Butandion-(2,3), EGA-Chemie

II. Methoden

1. Aktivitätsbestimmung der Proteinasen

a) Trypsin (59,26): Unter Verwendung von BAPNA als Substrat wird die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilin am Eppendorf-Photometer gemessen. Meßstrahl 405 nm; Schichtdicke 10 mm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Meßtemperatur 25° C; Meßzeit 5 min.

Ansatz: 0,2 ml einer Trypsinlösung (5 mg in 100 ml 0,0025 N HCl); 1,8 ml TRA-Puffer (0,2 M, pH 7,8); 1,0 ml BAPNA.

Variieren der Trypsinmenge zeigt, daß die Extinktionsänderung streng linear damit korreliert (59).

b) Chymotrypsin (59,26): Als Substrat dient SUPHEPA. Die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilin wird wie bei a) gemessen. Meßstrahl 405 nm; Schichtdicke 10 mm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Temperatur 25° C; Meßzeit 10 - 30 min.

Ansatz: 0,2 ml Chymotrypsinlösung, 1,8 ml TRA-Puffer (0,2 M mit 0,05 M $CaCl_2$, pH 7,8); 1,0 ml Substratlösung.

c) Kallikrein: Das Prinzip beruht auf der Bestimmung des bei Verwendung von BAEE als Substrat freigesetzten Äthanols mit der Alkoholdehydrogenase (ADH-Methode). Meßstrahl 366 nm; Schichtdicke 10 mm; Küvettenvolumen 3,0 ml; Temperatur 25° C; Meßzeit 10 min.

Vergleichsküvette: 0,1 ml Nikotinamid-adenindinukleotid (NAD); 2,38 ml Puffer (15,2 g Natriumpyrophosphat + 4,1 g

Semicarbazidhydrochlorid + 0,9 g Glycin in 400 ml deion. Wasser lösen, auf pH 8,7 einstellen und ad 500 ml auffüllen); 0,02 ml ADH.

Meßküvette: 0,1 ml NAD; 2,28 ml Puffer; 0,02 ml ADH; 0,1 ml Probelösung. Die Ansätze werden 10 min. vorinkubiert; Start nach Zugabe von je 0,5 ml BAEE-Lösung.

d) Plasmin: Die Aktivität von Plasmin wird in Modifizierung der Trypsinbestimmung mit BAPNA als Substrat festgestellt.

2. Bestimmung der Inhibitoraktivität

Diese erfolgte dadurch, daß bei den oben beschriebenen Enzymtesten ein Teil des Puffers durch inhibitorhaltige Lösung ersetzt wurde. Die verbleibende Enzymaktivität wurde gemessen und daraus die Inhibitoraktivität errechnet.

Die Hemmwerte müssen aus einer etwa 50 %igen Hemmung abgeleitet werden, da bei höheren Inhibitorkonzentrationen (ca. 70 - 90 %ige Hemmung) keine Linearität mehr zwischen Hemmwirkung und Konzentration besteht.

Eine Inhibitoreinheit 1 IU ist die Inhibitormenge, die unter Standardbedingungen die Aktivität einer Enzymeinheit 1 U zu hemmen vermag, d. h. den Substratumsatz um 1 µMol/min. reduziert (75,77). 1 mIU verringert bei Verwendung von BAPNA als Substrat die Extinktionsänderung ΔE um 0,00332/min. im 3 ml-Ansatz.

3. Gewinnung der Rohextrakte

Die Samenblasen männlicher Meerschweinchen wurden unmittelbar nach deren Tötung exstirpiert, in mit Trockeneis gefüllten Dewargefäßen eingefroren und transportiert und bis zur Aufarbeitung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

a) Homogenatherstellung

Die Samenblasen wurden in Portionen von 500 - 600 g mit etwa der dreifachen Menge deionisierten Wassers versetzt und mit dem Ultraturrax T 45 so lange homogenisiert, bis eine Aufschwemmung feiner Gewebsteilchen entstanden war. Anschließend wurde zentrifugiert und das Sediment so oft mit einem Drittel der zuerst eingesetzten Wassermenge aufgenommen, homogenisiert und zentrifugiert, bis die Inhibitorkonzentration in den Überständen nicht mehr nennenswert stark sank. Hierauf erfolgte dieser Arbeitsgang mehrmals mit 3 %iger Perchlorsäure, wobei etwa 25 % der Gesamtausbeute anfielen.

b) Enteiweißung

aa) mit Perchlorsäure

Die nicht enteiweißten Überstände wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen 6 %iger Perchlorsäure versetzt. Nach Abtrennung des ausgefällten Proteins durch Zentrifugation war ein Defizit an antitryptischer Aktivität von 50 % entstanden. Durch mehrmaliges Aufnehmen des Sediments mit 3 %iger Perchlorsäure konnten ca. 20 % der verlorenen Aktivität zuruckgewonnen werden, so daß der Verlust bei Enteiweißung mit Perchlorsäure etwa 40 % der Gesamtaktivität betrug. Die Neutralisation der Extrakte erfolgte

mit Kaliumhydrogencarbonat. Nach mehrstündigem Stehen im Kühlschrank wurde von ausgefallenem Kaliumperchlorat abfiltriert.

bb) durch Gelfiltration

Bei dieser Form der Enteiweißung mit Sephadex G-75 und anschließend G-50 konnten die Verluste auf 20 % reduziert werden.
Elutionsmittel: 0,02 M Ammoniumacetat, pH 7,0.
Säule: 4 x 160 cm.

c) Einengung

Sie erfolgte im Rotationsverdampfer im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe bei schwach saurer Reaktion (pH 5 - 6). Die Wasserbadtemperatur lag bei 30^{o} C. Der an den ausgefallenen Salzen adsorbierte Inhibitor wurde mit geringen Mengen deionisierten Wassers ausgewaschen.

d) Entsalzung

Vor der präparativen Auftrennung der Inhibitoren durch Ionenaustauschchromatographie wurden die Lösungen entsalzt. Hierfür kamen Sephadex G-25 fine und Bio - Gel P 2 zur Anwendung.
Elutionsmittel: 5 %ige Essigsäure. Säule: 2,8 x 95 cm.
Die Verluste bei diesem Schritt lagen unter 5 % der aufgetragenen Inhibitormenge. Nach der Entsalzung erfolgte die Gefriertrocknung.

4. Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex C-25

Die präparative Auftrennung der Inhibitoren in MTI und MTPI, sowie deren Zerlegung in ihre einzelnen Komponen-

ten erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex. Dieses wurde in die saure Form übergeführt und mit 0,02 M Ammoniumacetat, pH 5,4, äquilibriert. Eluiert wurde mit einem linearen Ammoniumacetatgradienten von 0,02 - 0,4 M. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug konstant 45 ml/h.

Zur Auftrennung in MTI und MTPI wurde eine Säule von 3 x 30 cm verwendet. An Puffer wurden je 1 000 ml 0,02 und 0,4 M, sowie zweimal 1 000 ml 0,2 M Ammoniumacetat, pH 5,4, eingesetzt.

Auftrennung von MTI und MTPI in ihre Komponenten: Je 1 100 ml 0,02, 0,2 und 0,4 M Ammoniumacetat, pH 5,4; Säule: 1,8 x 140 cm.

Die Fraktionen der einzelnen Aktivitätsgipfel wurden jeweils vereinigt, eingeengt und entsalzt. Hierauf erfolgten Lyophilisation und Rechromatographie der Hauptkomponenten unter denselben Bedingungen.

5. Bestimmung der spezifischen Aktivität

Eine bestimmte Menge an Inhibitor wurde eingewogen und in einem geeigneten Volumen deionisierten Wassers gelöst. Die Bestimmung der Inhibitoraktivität erfolgte mittels der Hemmtests. Aus den bekannten Größen ließ sich die spezifische Aktivität in mIU/mg bzw. µg Protein/mIU errechnen.

6. Charakterisierung der Inhibitoren

a) Bestimmung der Endgruppen

Zur Bestimmung der N-terminalen Gruppen wurde nach der

Methode von GRAY (29) Dansyl-Chlorid verwendet. Mittels zweidimensionaler Chromatographie auf Polyamidschichten (83) wurden die markierten Aminosäuren ermittelt.

1 - 10 Nanomol wurden in 10 µl 0,2 M Natriumhydrogencarbonat gelöst, kurz geschüttelt und im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nun erfolgten Zugabe von 10 µl aqua dest. und 10 µl Dansyl-Chlorid (2 mg 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid pro ml Aceton) und einstündige Inkubation bei 37° C. Nach nochmaliger Trocknung wurden 50 µl 6 N HCl zugefügt und 15 h bei 110° C in zugeschmolzenen Reagensgläschen inkubiert. Nach Eröffnung des Glases wurde kurz geschüttelt, über Natriumhydroxid getrocknet und in 10 µl 50 %igem Pyridin gelöst.

Hierauf kam es zur zweidimensionalen Chromatographie mit folgenden Laufmitteln und -zeiten:

I	1,5 %ige Ameisensäure	60 min.
II	Benzol/Eisessig 9:1	80 min.
III	Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig 20:1:1	50 min.

Die fluoreszierenden dansylierten Aminosäuren wurden im UV-Licht an Hand von Vergleichssubstanzen identifiziert.

b) Aminosäurezusammensetzung

Die Tryptophanbestimmung erfolgte aus den UV-Spektren, die am "Leitz-Unicam" aufgenommen wurden. Der Inhibitor wurde hierzu in 0,1 M NaOH gelöst (1 mg/ml). Nach 70-stündiger Inkubation wurde unter Verwendung von Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm) gemessen.

Zur Aminosäureanalyse wurde 1 mg Protein in 2 ml 6 N HCl unter Vakuum im zugeschmolzenen Glasröhrchen 20 h und 120 h

bei 110° C hydrolysiert. Die Entfernung der Säure erfolgte am Rotationsverdampfer bei 11 - 15 mm Hg. Nach der Methode von SPACKMAN, STEIN und MOORE (67) wurden die Hydrolysate analysiert (Beckman-Aminosäureanalysator und -Integrator).

7. Untersuchungen am reaktiven Zentrum

a) Modifizierung von Lysylresten (24)

Diese erfolgte durch Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (9)

aa) 1 mg Inhibitor, 15 mg Natriumhydrogencarbonat und 10 mg gepulvertes Maleinsaureanhydrid wurden in einem Zentrifugenglas zerrieben. Nach Zufügen von 0,25 ml einer 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung wurde die Suspension bei 0 - 4° C geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand. Mit 0,25 ml deionisiertem Wasser wurden am Glas haftende Teilchen in den Ansatz gespült. Nach 30-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden Proben der Lösung zur Bestimmung der Inhibitoraktivität entnommen.

bb) 1 mg Inhibitor wurde in 0,5 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat gelöst und mit 10 mg gepulvertem Maleinsäureanhydrid versetzt. Nach 10-minütigem Schütteln bei 0 - 4° C wurde die Mischung 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Es folgte wieder die Bestimmung der Inhibitoraktivität im Ansatz.

cc) Bis 0,3 mg Inhibitor wurden in 1 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat gelöst, mit 15 mg gepulvertem Maleinsäureanhydrid versetzt und 10 min. bei 0 - 4° geschüttelt. Nach Entnahme einer Probe zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurde der Ansatz erneut mit 10 mg Maleinsäure-

anhydrid versetzt und 10 min. bei 0 - 4° C geschüttelt, worauf wiederum die Bestimmung der Inhibitoraktivität erfolgte.

b) Modifizierung von Arginylresten (24)

Durch Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens (24,31) wurden spezifisch die Arginylreste modifiziert:

0,2 ml Inhibitorlösung, die bis 3 000 mIU enthielt, bzw. 0,2 ml der Ansätze von 7aa) oder 7bb) wurden mit 0,2 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,6) und 0,2 ml des Butandion-(2,3)-Reagens versetzt. Nach guter Durchmischung wurde bei 25° C inkubiert. Nach bestimmten Zeiten erfolgte die Entnahme von Proben zur Bestimmung der Inhibitoraktivität. Das Butandion-(2,3)-Reagens hatte keinen Einfluß auf die Aktivität des vorgelegten Trypsins, was durch einen nach Zugabe von 0,2 ml Reagens gemessenen Vergleichswert festgestellt wurde.

c) Versuche mit Carboxypeptidase B

Die Versuche wurden in 0,2 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, bei 25° C durchgeführt. Das Verhältnis von eingesetztem Protein zum Enzym war etwa 20 : 1.

F. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ADH	Alkoholdehydrogenase
AS	Aminosäure(n)
BAEE	Nα-Benzoyl-L-argininäthylester
BAPNA	Nα-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilidhydrochlorid
Dansyl-chlorid	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid
mIU	Inhibitor-Milliunit
mU	Enzyme-Milliunit
MTI	Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen
MTPI	Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Meerschweinchensamenblasen
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
SE-Sephadex	Sulfoäthyl-Sephadex
SUPHEPA	N-Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid
TRA	Triäthanolamin-hydrochlorid

G. LITERATUR

1 Anderer, F. A., S. Hörnle, Z. Naturforsch. 20b, 457 (1965)
2 Anderer, F. A., Z. Naturforsch. 20b, 499 (1965)
3 Astrup, T., 18th Int. Physiol. Congr. Copenhagen 1950, Abstracts p 81
4 Back, N., H. Wilkens, R. Steger, Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 491 (1968)
5 Bauer, E., E. K. Frey, H. Kraut, F. Schultz, E. Werle, Naturwissenschaften 17, 672 (1929)
6 Belohlawek, L., Ber. Getreidechemiker-Tagung, Detmold 1964, S. 19
7 Bowman, D. E., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 139 (1944)
8 Burck, P. J., R. L. Hamill, E. W. Cerwinsky, E. L. Grinnan, Biochemistry 6, 3180 (1967)
9 Buttler, P. J. G., J. I. Harris, B. S. Hartley, R. Leberman, Biochem. J. 103, 78 P (1967)
10 Creutzfeldt, W., H. Schmidt, I. Horbach, Klin. Wschr. 43, 15 (1965)
11 Fink, E., Dissertation, Naturw. Fakultät der Univ. München, 1970
12 Finkenstadt, W. R., M. Laskowski jr., J. biol. Chem. 240, PC 962 (1965)
13 Finkenstadt, W. R., M. Laskowski jr., J. biol. Chem. 242, 771 (1967)
14 Forell, M. M., E. Werle, A. Meyer, VII. Int. Kongr. Inn. Med., München 1962
15 Forell, M. M., Pharmacotherapia 1, 79 (1963)
16 Fritz, H., I. Trautschold, G. Hartwich, E. Werle, Fed. Europ. Biochem. Soc. II. Meeting, Wien 1965
17 Fritz, H., G. Hartwich, E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966)

18 Fritz, H., H. Schult, M. Neudecker, E. Werle, Angew. Chem. 78, 775 (1966)

19 Fritz, H., F. Woitinas, E. Werle, Z. physiol. Chem. 345, 168 (1966)

20 Fritz, H., I. Hüller, M. Wiedemann, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 405 (1967)

21 Fritz, H., H. Schult, M. Hutzel, M. Wiedemann, E. Werle, Z. physiol. Chem. 348, 308 (1967)

22 Fritz, H., Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Univ. München, 1968

23 Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle, Ann. N. Y. Acad. Sci. 146, 400 (1968)

24 Fritz, H., E. Fink, M. Gebhardt, K. Hochstrasser, E. Werle, Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969)

25 Fritz, H., M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm, E. Werle, Z. physiol. Chem. 350, 129 (1969)

26 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle, in: Bergmeyer, H. U. "Methoden der enzymatischen Analyse", Weinheim 1970

27 Goodwin, T. W., R. A. Morton, Biochem. J. 40, 628 (1946)

28 Gorini, L., L. Audrain, Biochim. biophys. Acta 10, 570 (1953)

29 Gray, W. R., in: "Methods in Enzymology", Vol. XI, New York 1967, S. 139

30 Green, N. M., E. Work, Biochem. J. 54, 347 (1953)

31 Grossberg, A. L., D. Pressman, Biochemistry (Washington) 7, 272 (1968)

32 Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle, Z. physiol. Chem. 343, 185 (1965)

33 Haendle, H., Dissertation, Med. Fakultät der Univ. München, 1969

34 Ham, W. E., R. M. Sandstedt, J. biol. Chem. 154, 505 (1944)

35 Haynes, R., R. E. Feeney, J. biol. Chem. 242, 5378 (1967)

36 Haynes, R., D. T. Osuga, R. E. Feeney, Biochemistry (Washington) 6, 541 (1967)

37 Haynes, R., R. E. Feeney, Biochemistry (Washington) 7, 2879 (1968)
38 Hixson, H. F. jr., M. Laskowski jr., J. biol. Chem. 245, in press (1970)
39 Kazal, L. A., D. S. Spicer, R. A. Brahinsky, J. Amer. chem. Soc. 70, 3034 (1948)
40 Kendall, K. A., J. Dairy Sci. 34, 499 (1951)
41 Klein, G., Dissertation, Med. Fakultät der Univ. München, 1970
42 Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle, Z. physiol. Chem. 192, 1 (1930)
43 Kunitz, M., J. H. Northrop, J. gen. Physiol. 19, 991 (1936)
44 Kunitz, M., J. gen. Physiol. 30, 291 (1947)
45 Kunitz, M., J. gen. Physiol. 30, 311 (1947)
46 Kunitz, M., J. gen. Physiol. 32, 241 (1948)
47 Kwaan, H. C., T. Astrup, Arch. Path. 78, 474 (1964)
48 Laskowski, M., F. C. Wu, J. biol. Chem. 204, 797 (1953)
49 Laskowski, M., M. Laskowski jr., in: M. L. Anson, K. Bailey, J. T. Edsall "Adv. in Protein Chemistry", IX, 203 (1954)
50 Laskowski, M. jr., M. Laskowski, J. biol. Chem. 190, 563 (1951)
51 Laskowski, M. jr., R. W. Sealock, "The Enzymes", 3. Auflage im Druck
52 Luthy, J. A., M. Praissman, M. Laskowski jr., Abstracts, 158th National Meeting of the American Chemical Society, New York, N. Y., Sept. 1969
53 Markus, G., W. C. Werkheiser, Fed. Proc. 21, 64 (1962)
54 Marx, R., Thrombos. Diathes. haemorrh., Suppl. ad Vol. II (1958). Bericht 2. Symp. DAB Heidelberg 1956
55 Marx, R., P. Clemente, E. Werle, W. Appel, Blut 5, 367 (1959)

56 Marx, R., Klin. Demonstration der I. Med. Univ. Klinik München, Nov. 1960

57 Mason, B., E. M. Sparrow, Brit. J. Pharmacol. 25, 257 (1965)

58 Meyer, A., Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Univ. München, 1964

59 Nagel, W., F. Willig, W. Peschke, F. H. Schmidt, Z. phys. Chem. 340, 1 (1965)

60 Ozawa, K., M. Laskowski jr., J. biol. Chem. 241, 3955 (1966)

61 Pinsker, M. C., W. L. Williams, Arch. Biochem. Biophys. 122, 111 (1967)

62 Ryan, C. A., A. K. Balls, Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1839 (1962)

63 Ryan, J. W., J. G. Moffat, A. G. Thompson, Nature 204, 1212 (1964)

64 Schön, H., N. Henning, Klin. Wschr. 41, 201 (1963)

65 Shyamala, G., R. L. Lyman, Canad. J. Biochem. 42, 1825 (1964)

66 Sohonie, K., K. S. Ambe, Nature 175, 508 (1955)

67 Spackman, D. H., W. H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

68 Stambaugh, R., J. Buckley, Science 161, 585 (1968)

69 Stambaugh, R., J. Buckley, J. Reprod. Fert. 19, 423 (1969)

70 Steiner, R. F., Arch. Biochem. 49, 71 (1954)

71 Thal, A. D., E. E. Kobold, H. I. Hollenberg, Amer. J. Surg. 105, 708 (1963)

72 Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening, Z. physiol. Chem. 332, 328 (1963)

73 Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening, Europ. Pankreas Symposion 1963

74 Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening, in: Henning, Heinkel u. Schön "Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas", Schattauer Verlag, Stuttgart, 1964

75 Trautschold, I., Habilitationsschrift, Med. Fak. der Univ. München, 1965

76 Tschesche, H., H. Klein, Z. physiol. Chem. 349, 1645 (1968)

77 Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle, in: "Natürliche Proteinasen-Inhibitoren", Thieme Verlag, Stuttgart, 1966

78 Walser, K., K. Ernst, Tierärztl. Wschr. 77, 393 (1964)

79 Werle, E., L. Maier, F. Löffler, Biochem. Z. 321, 372 (1951)

80 Werle, E., L. Maier, Biochem. Z. 322, 414 (1952)

81 Werle, E., L. Maier, Biochem. Z. 323, 279 (1952)

82 Werle, E., K. Tauber, W. Hartenbach, M. M. Forell, Münch. med. Wschr. 100, 1265 (1958)

83 Woods, K. R., K.-T. Wang, Biochim. biophys. Acta 133, 369 (1967)

84 Wu, F. C., M. Laskowski, J. biol. Chem. 213, 609 (1955)

85 Zaneveld, L. J. D., P. N. Srivastava, W. L. Williams, J. Reprod. Fert. 20, 337 (1969)

Herrn Professor Dr. Dr. E. Werle danke ich für die Gewährung eines Arbeitsplatzes, Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Fritz für die Überlassung des Themas und stets freundliche Unterstützung. Auch Herrn Dipl.-Chem. Dr. E. Fink sei an dieser Stelle für wertvolle Ratschläge sehr herzlich gedankt.

LEBENSLAUF

Am 14.4.1943 wurde ich als zweiter von vier Söhnen des Bergmanns Friedrich Hammer und seiner Ehefrau Franziska, geb. Müller, in Amberg/Opf. geboren.

Dort besuchte ich von 1949 bis 1954 die Volksschule. Im Jahre 1954 trat ich in die Oberrealschule Amberg ein, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Herbst 1963 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen - Nürnberg das Studium der Humanmedizin und studierte vom Sommerhalbjahr 1964 an zwei Semester Paedagogik und Betriebswirtschaftslehre. Im Sommer 1965 nahm ich das Medizinstudium wieder auf.

Am 10. November 1967 bestand ich an der Universität Erlangen - Nürnberg die ärztliche Vorprüfung.

Die ersten beiden klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls an der Universität Erlangen. Im Winterhalbjahr 1968/69 kam ich an die Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich bis zum Sommer 1970 vier klinische Semester absolvierte.

Im November 1970 erfolgte meine Verehelichung mit Fräulein Monika Eberlein.